

<p>56352W/34 MICROBIOCH RES FOUN 01.08.73-JA-085884 (04.04.75) isoflavone cpd. inhibiting catechol-O-methyl transferase - prepd. by culture of <i>Actinomyces roseolus</i> ISP-5174</p>	<p>802 D16 ZAID 01.08.73 *JS 0035-393</p>	<p>B6-A1, B12-F5, B12-G1. yellow (I) m.pt. 176°, yellow (II) m.pt. 180° and brown (III) m.pt. 215° powders were obtd. at 58.0, 24.0, and 12.5 mg resp. from 4 l filtrate, (IV) was inhibited at 50% by 50, 78, and 5 γ of cpds. (I), (II) and (III), resp. The cpds. also inhibited histidine decarboxylase. The cpds. reduced the blood pressure.</p>	<p>Novel isoflavon cpds. (I), (II) and (III)</p> <div data-bbox="617 1617 795 2016"> </div> <p>(I) (X=H, Y=OMe, Z=OH) (II) (X=OMe, Y=H, Z=OH) (III) (X=OMe, Y=OMe, Z=H)</p> <p>inhibiting catechol-o-methyl transferase (IV) were produced by <i>Actinomyces roseolus</i> ISP 5174. In example the microbe was cultured on a medium (pH 7.4) contg. soybean cake 2, glucose 1, starch 2, NaCl 0.25, CaCO₃ 0.35, CuSO₄ 5H₂O 0.0005, MnCl₂ 4H₂O 0.0005 and ZnSO₄ 7H₂O 0.005% at 27° for 5 days. The cpds. were extd. with BuOAc from the culture filtrate, concd. pptd. with petroleum ether, dissolved in Me₂CO, and fractionated by a silica gel column chromatog. By concn. to dryness of each fraction, pale</p>
---	---	--	--

BEST AVAILABLE COPY



(2000円)

特許願

第 1 号

昭和48年8月1日

特許庁長官 殿

1. 発明の名称 カタコールメタル転移酵素の阻害作用を有する新規イソフラボン化合物の微生物による製造法

2. 発明者 住所 東京都練馬区豊玉北4の23

氏名 梅 沢 英 夫

外4名

3. 特許出願人 住所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名称 財団法人微生物化学研究所

代表者 市 川 清 二

一 国 籍

4. 代理人 住所 〒105 東京都港区四新橋1丁目2番9号 2274 三井物産館内 電話(591)0061番

(2400) 氏名 金 丸 義 男 外4名

⑬ 日本国特許庁

公開特許公報

⑪特開昭 50-35393

⑬公開日 昭50.(1975) 4. 4

⑭特願昭 48-85884

⑮出願日 昭48.(1973) 8. 1

審査請求 未請求 (全12頁)

庁内整理番号 7048 49

7110 49 6910 44

7048 49

⑫日本分類

36(2)D521

36(2)D914

36(2)C0

16 E41

⑬Int. Cl²

C12D 13/10

A61K 27/64

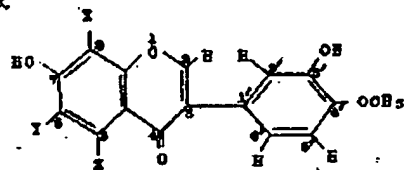
明 細 書

1. 発明の名称

カタコールメタル転移酵素の阻害作用を有する新規イソフラボン化合物の微生物による製造法

2. 特許請求の範囲

放線菌に属する新規イソフラボン化合物生産菌株を好意的に培養してカタコールメタル転移酵素を阻害するイソフラボン化合物を生成せしめ、これを培養物から採取することを特徴とする一般式



X = H, Y = OCH₃, Z = OH (化合物①)

X = OCH₃, Y = H, Z = OH (化合物②)

X = OCH₃, Y = OCH₃, Z = H (化合物③)

を有するカタコールメタル転移酵素の阻害作用を有する新規イソフラボン化合物(①, ②, ③)の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はカタコールメタル転移酵素(以下 COMT と略記する)の強力な阻害剤である 5',8'-トリハイドロキシ-6,8-ジメトキシ-イソフラボン(Ⅰ), 5',8,9-トリハイドロキシ-6,8-ジメトキシ-イソフラボン(Ⅱ)及び5,7-ジハイドロキシ-6,8-トリメトキシ-イソフラボン(Ⅲ)の製造法、特に微生物を培養して、その培養物からこれ等の化合物を採取する方法に関するものである。

本発明者等はカタコールアミン類のカタコール骨格の7位の水酸基をメチル化する COMT の阻害物質を系統的に探索し、放線菌の培養液及び菌体内にその阻害物質の存在をみだし、これを分離精製して、化学構造の研究を行い、これ等がイソフラボン骨格を持つ事を見出しさらに化学的な詳細な研究からこれ等は上記①, ②, ③の化学構

造を有する新規化合物であることを明らかにすると共に、微生物を培養して、培養物からこれ等の化合物を採取する方法を発明した。

本発明以前には天然物中にも化学合成物中にも化合物(I)、(II)、(III)は報告されていない。實がつて(I)、(II)、(III)の化合物を採取したのは本発明者等が最初である。

本発明以前には0087の阻害剤は外部より注入されたアドレナリン、ノルアドレナリン等の消失速度を遅らせ、アドレナリン、ノルアドレナリンによる血圧上昇作用の延長及び増強作用を有する事が報告され、又この阻害剤には内在のカテコールアミン類の減少によつて起るとされているうつ病などの病気の治療剤となる可能性が考えられる。さらに分枝病の病因は種々いわれているがその一つに生体アミンの異常メチル化物(カテコールアミン、セロトニンのメチル化物)が体内で蓄積することが原因であると云う仮説があり、特に分枝病病状における幻覚症状の発現はカテコールアミン類の異常メチル化物によつて起ると言われている。

の事により化合物(I)、(II)、(III)は高血圧症及び動脈硬化症などの病気の治療剤としての可能性及びパーキンソン症候群のドーパミンの代謝に關しての阻害剤となり得る可能性などが期待される。さらに化合物(I)、(II)がヒスタジン脱炭酸酵素を阻害する事を発見したがこの事は人の発症及びアレルギー症の治療剤としての可能性も考えられる。

本発明以前には前記インフラボン類(I)、(II)、(III)は天然物のなかには存在する事が知られていなかったが本発明者等は放線菌の菌類群集後ISP 5174であるアクチノミセス・ロゼオルス(*Actinomyces roseolus*) ; 文献 R.B. Shirling 等, International Journal of Systematic Bacteriology, 18巻, 167頁, 1968年; O.P. Gaude, Zur Klassifizierung der Actinomyceten, 28頁, 1958年 (Verlag Gustav Fischer Verlag, Jena) を培養して、培養物から前記化合物(I)、(II)、(III)を数多く採取する方法を発明した。なお、本開明を昭和48年2月14日、工業技術院微生物工業技術研究所に保管

(文献; H.E. Rimwich, S.S. Kety, J.R. Smythies; Amines and Schizophrenia, 1967年, Pergamon Press, Oxford)。そこでCOMTの阻害剤は分枝病及びその幻覚症状の治療剤としての可能性が考えられる。またインフラボン類の抗凝血作用が村田、他等によつて報告され(Agr. Biol. Chem., vol 32, No. 740~746, 1968)、さらにコレステロールの蓄を防ぐ事がモールス、モロー、ムニョリス等(O.W. Moersch, D.W. Morrow, W.A. Muniz; J. Med. Chem., 10巻, 154~158, 1967)によつて報告されている。また本発明者等はデイビス、アワバラ等(Y.E. Davis, J. Awabara; J. Biol. Chem., 238, 184~187, 1963)のドーパ脱炭酸酵素の活性の測定法を用いて化合物(I)、(II)、(III)のこの酵素に対する阻害度を測定し、化合物(I)、(II)が強く本酵素を阻害し、化合物(III)は阻害を示さない事を発見した。又化合物(I)、(II)、(III)を高血圧自然発症ラットに投与した時、その血圧を低下させる事を発見した。これ等

を既申請し、微生物発酵番号はカ1000号である。

本発明により、化合物(I)、(II)、(III)はそれを生産する菌株を通常の微生物の培養法として公知の方法で培養して培養物中に生産せしめられる。例えば化合物(I)、(II)、(III)の生産菌アクチノミセス・ロゼオルスは、グリセリン・アムブラゼン琼脂培地、酵母麦芽米天培地等の公知の培地に継代培養され、化合物(I)、(II)、(III)の生産のためにこれ等の継代培地上の発育菌糸を固形培養培地に接種して培養できる。また放線菌培地に発育せしめた菌糸を糖液として生体培地に接種して培養し生産せしめる事ができる。

アクチノミセス・ロゼオルスは25~35℃で発育するがこれ等の化合物の生産には25~30℃が好ましい。

アクチノミセス・ロゼオルスを生産して化合物(I)、(II)、(III)を生産せしめるためには、カビ、不完全菌、放線菌、細菌などの微生物の培養に公知の培養法はすべて利用できる。例えばグルコース、

マルトース、ラクトース、サッカロース、グリセリン、デキストリン、澱粉、大豆油、糖蜜等を栄養源として利用できる。大豆粕 2.0 g、豚油エキス 0.5 g、 NaOH 0.2 g、 CaCO_3 0.3 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 gを含む培地を基礎培地として、上記の栄養源を下記の表に示す様に添加した培地 128 ml を 500 ml の坂口フラスコに分注して、180℃で30分間、加圧殺菌し、これにグリセリン・アスベラギン無天飼育培地に27℃で14日間培養した菌糸を一日食料接種し、27℃で振盪培養したとき、培地5日目のCOMTの阻害率を下記の様であった。

培地の種類と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
マルトース 2%	7.2	× 2	25%
ラクトース 1% 澱粉 0.5%	7.2	○	55%
大豆粕 2% 大豆油 0.5%	7.2	○	30%
ラクトース 1% サッカロース 1%	7.5	○	25%
ラクトース 1% 澱粉 1%	7.2	○	25%

培地の種類と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
グリセリン 2%	8.0	× 2	25%
ラクトース 2%	7.5	○	55%
ラクトース 2% グリセリン 2%	7.5	○	20%
グリセリン 2% アスベラギン 2%	7.2	○	50%
澱粉 2%	7.0	○	50%

上記の様に何れの栄養源もこれらの化合物の生産に利用できるが特にグルコース、澱粉が好適な栄養源である。

化合物①、②、③の生産のために放線菌、カビ、不完全菌、細菌その他の微生物の培養のために用いられる栄養源はすべて利用できる。例えばペプトン、肉エキス、豚油エキス、大豆油、大豆粕、コンスタイブリーカー、カゼイン、糖蜜等が利用できる。上記の様にグルコース 2 g、澱粉 2 g、 NaOH 0.2 g、 CaCO_3 0.3 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 gを含む培地を、下記の表に示す様に栄養源を添加して殺菌し、これに前記の無天飼育培地に培養せしめた菌糸を接種して5日間培養したとき、COMTの阻害率を決定すると次の如くであった。

培地の種類と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
大豆粕 2.0% コンスタイブリーカー 0.5%	7.2	× 2	58.0%
糖蜜 2.0%	7.2	○	48.0%
肉エキス 2.0% 豚油エキス 0.5%	7.5	○	51.0%
大豆油 2.0% カゼイン 0.5%	7.2	○	50.0%
糖蜜 2.0% コンスタイブリーカー 0.5%	7.2	○	50.0%

培地の種類と濃度	pH	培養液	COMT阻害率
肉エキス 0.5% ペプトン 0.5%	7.2	× 2	18.0%
大豆粕 2.0% 糖蜜 0.5%	7.5	○	55.0%
大豆粕 2.0% (アミノ酸)	7.5	○	48.0%
大豆油 2.0% (アミノ酸)	7.2	○	45.0%
大豆粕 2.0% コンスタイブリーカー 0.5%	7.2	○	50.0%

上記の様に何れの栄養源も利用できるが、大豆粕、酵母エキスが好適な栄養源であつた。

化合物①、②、③を生産せしめるために必要とするならば無機塩、金属塩、重金属塩の量を加える。又地盤地層中、培養中に消滅を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消滅剤を使用できる。

化合物①、②、③は生菌菌アタナノミセス・ロヤノルスを好発的に培養して得られるが、ペニシリン等の抗生物質の生産のために用いられる通気槽持メック培養法がそのまゝ本発明に用いられる。また化合物①、②、③の培養液中での濃度は以上に掲げた培養での諸条件によつて異なる事は専門家に於て公知の事実である。したがつて菌株の改良、培養条件の選択によつて単一の化合物のみを生産せしめる事、特定の化合物を合理的に生産せしめる事は専門家に於て容易な事である。この説明はそれ等のすべての準備方法をも包括するものである。

化合物①、②、③は0.0 M Tの阻害によつて定

阻害度を求める。

また化合物①、②、及び③はヒスタジン脱炭酸酵素も阻害するが、その阻害活性は次の方法で測定される。すなわち反応組成は1-ヒスタジン-2-¹⁴C (1.0×10^6 cpm) の 2.5×10^{-4} モル、ピリドキサル磷酸 (3.7×10^{-5} モル)、ヒスタジン脱炭酸酵素 (濃度 1 単位/μl) 0.1 cc、0.6 M モル磷酸緩衝液 (pH 6.8) 0.1 cc、試料溶液を加えて蒸留水で全量を 2 cc とする。この反応液を 37°C、8 時間反応後、生成するヒスタミン-2-¹⁴C をアンバーライト CG-80 のアンモニウム型に吸着させ、水洗後 1 規定アンモニウム水で吸着したヒスタミンを洗脱させ、洗出液を一定量取り放射能活性を液体シンチレーションカウンタで測定し、生成したヒスタミン量を測定してその阻害度を求める。

次に化合物①、②、③の抽出精製について記述する。これ等の化合物はアルカリ性の水、メタノール、エタノール、アセトン等の溶媒に溶解、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等に溶かして

得てくる。0.0 M T の活性はニコチンエビック等が報告した方法に準じて測定される (文献: B. Nikodejevic 等, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; vol 174, 88~93 頁, 1970 年)。反応液の組成は水 0.1 M 8 cc、0.1 モル・磷酸緩衝液 (pH 8.0) 0.05 cc、0.1 モル・塩化マグネシウム溶液 0.1 cc、0.05 モル・アドレナリン溶液 0.05 cc、0.6 M リモル・トリチウム-8-アデノシルメチオニン水溶液 (2.2×10^6 cpm) 0.076 cc、試料溶液 0.05 cc、酵素溶液 0.05 cc で総容量 0.5 cc である。上記の溶液を 0°C で混合し、37°C で 20 分間反応させた後 0.5 モルの酢酸緩衝液 (pH 10.0) を 1 cc 加えて反応を止め、蒸留アドレナリンのメタ位の水酸基がメチル化されたトリチウムメタネフリン (³H-metanephrine) をトルエン-イソアミルアルコール (3:1) の混合溶液で抽出し、揮発部を一定量取り、液体シンチレーションカウンタで放射能活性を測定し、それより生成したメタネフリン量を測定し、その

解する。これ等の化合物は培養液から酸性でブタノール、酢酸ブチル等に抽出され、固体樹脂部からはメタノール、アセトン等で抽出される。この固体樹脂部からの抽出液は減圧蒸留によつて濃縮され、濃縮液は酸性に調整後酢酸ブチル、ブタノール等によつて抽出され、培養液内から抽出された酢酸ブチル、ブタノール等の溶液と混合して減圧濃縮範囲する。

上記の様にして得た抽出範囲物は石油エーテル、ノルマルヘキサン等で処理すると①、②、③の化合物は共に不溶部に移行する。さらにこの不溶部をアセトンで抽出すると酢酸部に活性部が移行し、残部は不溶部として残される。このアセトン抽出液を減圧濃縮範囲し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、ベンゼン-アセトン (10:1) で押出すと活性の強い三個のフラクションに分離される。さらに各々の活性部の活性物質はセファグクス LH-80 を用いたカラムクロマトグラフィー、アルミナを用いたカラムクロマトグラフィー、必要時はシリカゲルの再ク

ロマトグラフィーによつて精製され、最初の活性フラクションからは化合物①、2番目からは化合物②、最後のフラクションからは化合物③が各々結晶として単離される。

これ等の化合物の理化学的性質は下記の表1のごとくであり、さらに詳細な化学構造の研究の結果、化合物①はγ,δ,ε-トリヒドロキシ-δ,ε-ジメトキシ-イソフラボン、化合物②はγ,δ,ε-トリヒドロキシ-δ,ε-ジメトキシ-イソフラボン、化合物③はγ,ε-ジヒドロキシ-δ,ε,8-トリメトキシ-イソフラボンであると本発明者等は決定した。

表 1

理 化 学 的 性 質	I	II	III
性 状 (融 点)	淡黄色針状 (176°)	黄 色 針 状 (180°)	無 色 針 状 (216°)
元 素 分 析 例 (%)	C:61.02, H:4.51, O:33.29	C:61.63, H:4.80, O:34.31	C:62.80, H:4.79, O:32.35
マ ス ス ペ ク ト ル	530	530	544
分 子 式 (分 子 量) と 融 点 値	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ (330.28) C:61.02, H:4.51, O:33.29	C ₁₇ H ₁₄ O ₆ (330.28) C:61.63, H:4.80, O:34.31	C ₁₈ H ₁₆ O ₆ (344.32) C:62.87, H:4.68, O:32.53
塩 化 第 Ⅲ 鉄 反 応	⊕ 黄 色	⊕ 黄 色	⊕
ギ ョ ッ プ ス の 反 応	黄 色	黄 色	黄 色
-OCH ₃ の 数 (NMR から)	2	2	3
アセチル基の導入数 (NMR から)	2	3	2
赤 外 吸 収 係 数 (Jouy)	1) 3400.0cm (log ε: 4.800), 2900cm (ε) 2) 1650.0cm (log ε: 4.300), — 3) 1570.0cm (log ε: 4.300), 1540cm (ε)	1) 3400.0cm (log ε: 4.318), 2900cm (ε) 2) 1650.0cm (log ε: 4.300) 3) 1570.0cm (log ε: 4.300)	1) 3400.0cm (log ε: 4.318), 2900cm (ε) 2) 1650.0cm (log ε: 4.318), 2900cm (ε) 3) 1570.0cm (log ε: 4.300) —
赤 外 吸 収 マ ス ク	3600 1650 1630 1600 1580 1470 1380 1300 1280 1260 1170 1130 1090 1020 1000 990 900 870 820 810 780 730 670	3400 1650 1630 1600 1570 1430 1370 1320 1270 1250 1170 1130 1080 1030 990 940 900 860 820 810 750 720 670	3600 1650 1630 1600 1570 1470 1380 1320 1280 1270 1220 1180 1150 1100 1050 1020 1000 980 920 900 860 800 780 720 710
NMR (DMSO-d ₆) 100MHz (ppm)	10.80(OH):s 10.74(OH):m 9.08(OH):m 6.33(H):s 7.06(H):s 6.97(H):s } アロマチックプロトン 6.82(H):s } アロマチックプロトン 4.70(H):s } 0CH ₃ 6.82(H):s } 0CH ₃	12.05(OH):s 10.98(OH):m 9.04(OH):m 6.40(H):s 7.06(H):s 6.97(H):s } アロマチックプロトン 6.33(H):s } アロマチックプロトン 5.70(H):s } 0CH ₃ 5.81(H):s } 0CH ₃	10.00(OH):m 9.00(OH):m 8.30(H):s 7.07(H):s } アロマチックプロトン 6.98(H):s } アロマチックプロトン 5.00(H):s } 0CH ₃ 5.85(H):s } 0CH ₃ 5.81(H):s } 0CH ₃
薄 層 ク ロ マ ト (シリカゲル)	1) 0.30 2) 0.30 3) 0.65	1) 0.25 2) 0.31 3) 0.60	1) 0.10 2) 0.21 3) 0.50

次に化合物(I)、(II)、(III)の生物学的性状について記述する。化合物(I)、(II)、(III)の毒性は25%ジメチルスルホキシド水溶液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したとき200mg/kgで毒性を示さなかつた。

前述の測定法でOOMT活性の50%阻害の濃度を求めると化合物(I)は0.5γ/α(1.515×10^{-6} モル)、化合物(II)は5.0γ/α(1.515×10^{-6} モル)、化合物(III)は0.3γ/α(3.80×10^{-7} モル)であつた。なおこれ等の物質は本発明者等が記載した方法でテロシン水酸化酵素(J. Antibiotics, 21, 350, 1968)及びドーパミン水酸化酵素(J. Antibiotics, 21, 354, 1968)の阻害活性を測定したが100γ/αでそれ等の酵素の阻害作用は認められなかつた。さらに前記の方法でドーパミン酸化酵素の阻害を調べると化合物(I)は12.0γ/α(3.79×10^{-6} モル)、化合物(II)は5.0γ/α(1.515×10^{-6} モル)で50%の阻害率を示したが化合物(III)は100γ/αで阻害を示さなかつた。又前述の制

阻法でヒスチジン脱炭酸酵素の阻害を調べると化合物(I)は5.0γ/α(1.5×10^{-6} モル)、化合物(II)は1.5γ/α(4.5×10^{-7} モル)で50%の阻害率を示したが、化合物(III)は10.0γ/αの濃度で約51.9%の弱い阻害率を示した。上記のように化合物(II)は他の酵素の阻害活性を示さずOOMTのみに阻害活性を示す極めて特異的な化合物である。

化合物(I)、(II)、(III)は100γ/αで頭蓋腔、カビ菌に対して発育阻止作用を示さなかつた。

又化合物(I)、(II)、(III)を高血圧自然発症ラットの腹腔内に投与し、その血圧降下作用を調べた結果の3例を示すと化合物(I)では50mg/kgの投与で1時間後20.0%、5時間後10.4%、8時間後50.0%、24時間後3.8%、12.5mg/kgの投与で1時間後13.8%、5時間後10.9%、8時間後10.8%、24時間後7.8%の血圧降下作用を示した。化合物(II)は50mg/kgの投与で1時間後22.5%、5時間後30.9%、8時間後35.3%、24時間後23.9%、6.8時間後

15.5%、12.5mg/kgの投与で3時間後10.4%、5時間後34.4%、8時間後39.8%、24時間後10.0%、48時間後10.0%、5.1mg/kgの投与で1時間後21.0%、3時間後26.5%、5時間後30.0%、24時間後28.0%、48時間後13.4%の血圧降下作用を示した。

化合物(III)では50mg/kgの投与で1時間後11.9%、5時間後13.0%、8時間後17.3%、24時間後7.0%、48時間後、3.8%の弱い血圧降下作用を示した。

以下、本発明によるインフラマン類の新規化合物(I)、(II)、(III)の製造法の実施例を示すが、本発明により化合物(I)、(II)、(III)が微生物で造られる事が明らかにされたのでこの明細書に記された知見に基づいて、本明細書に記された方法を修飾した方法が容易に規定される。本発明者等が微生物が造る酵素阻害物質の系統的研究で示した様に、酵素阻害物質の生産は特定の菌種に限らない。かくして本発明で放線菌の一種による化合物(I)、(II)、(III)の生産が明らかにされたので放線菌の他の菌種を

用いて生産せしめる事は専門家にとつて容易な事である。

本発明はそのすべての修飾方法をも包括し、実施例はその例示で、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 1

化合物(I)、(II)、(III)を生産する放線菌アフラノミサス・ロゼオルス(Grisey)をグリセリン・アセパラゼン寒天斜面培地に24日発生させ、その菌落液から一白金耳量、大豆粉2g、グルコース1g、澱粉2g、 NaCl 0.20g、 CaCO_3 0.55g、 $\text{O}_2\text{SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 0.0005g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005g、 $2\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005gを含む培地を殺菌後PH7.4に修正して、125cc、200ccの坂口コルベに分注し、120℃、20分間殺菌した培地に接種し、27℃で毎日150往復の振盪機で8日間培養した。PHは接種前7.0、2日後6.8、3日後6.4、4日後6.5、5日後7.2であつた。培養中の菌液はペルトラン法で還元糖を分析すると、2日後で

2.85g、3日後で1.00g、4日後で0.65g、5日後で0.25gであつた。この培養液5000ccを伊通して伊液4000ccを得た。この伊液の0.01M阻害活性は3倍に希釈して0.4gの阻害率を示した。この4000ccの伊液を2M-HClでPH 2.0に修正し4000ccの酢酸ブチルで抽出し(収率80%)。抽出液を外温60℃で減圧濃縮乾燥すると18.5gの赤褐色のシラップ状物質が得られ、さらに石油エーテル1000ccで処理すると9.5gの石油エーテル不溶部が得られ、この0.01Mの阻害活性は250%で60%の阻害率を示し、石油エーテル可溶部はほとんど阻害率を示さなかつた。得られた石油エーテル不溶部をアセトン1000ccに溶解させて不溶部を除き、30gのマリンダロフト社製のシリカゲル(AE-100~200メッシュ)をアセトン溶液中に加えて減圧濃縮乾燥させ、ベンゼン(アセトン(10:1)の溶液系でシリカゲル(前記マリンダロフト社製)500gをゲル化させ5×90cmのカラムに充填したカラムを用いて、

ヤーファーマンター(4基分)の培養液4.5gをベクトラ型の遠心分離機で毎分2000回転で遠心分離を行い、伊液40g、固形固形部8gが得られ、固形固形部は5gのメタノールで抽出するとメタノール溶液4.8gが得られた(伊液は2.5gで60%、メタノール抽出液は2.5gで80%の0.01Mの阻害率)。メタノール抽出液を500ccまで減圧濃縮し、伊液と合せて4M-HClでPH 2.0とし実施例1と同様の比率で酢酸ブチル抽出を行い、抽出液を減圧濃縮乾燥すると80.0gの油状物質が得られ、さらに石油エーテル4.0gで処理すると石油エーテル不溶部は35.0gの褐色の粉末が得られ、この粉末の活性は全体の55%であつた。この粉末を実施例1で示した方法の3倍の比率で、実施例1と同様にカラムクロマトグラフィーを行い最初の活性部からは790mgの黄色粉末、2番目からは280mgの黄色粉末、3番目からは160mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末の0.01Mの80%阻害率は各々20%, 80%, 2.0%であつた。

その上層に乾燥物を乾燥させ、前記の溶液系でカラムクロマトグラフィーを行うと活性部が3個のフラクションに成つて蒸出され、最初のフラクション750ccを濃縮乾燥すると淡黄色の粉末58.0mgが、2番目のフラクション1000ccからは黄色の粉末34.0mgが、最後のフラクション1500ccからは18.5mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末の阻害阻害率は各々80%, 75%, 5%で80%の阻害率を示した。

実施例 2

実施例1と同様の方法で培養を調整し、同様の方法で培養培養を行い、培養3日目の培養液5000ccを、実施例1と同組成の培養液50g容のジャーファーマンターに14g宛仕込み、120℃、50分間高熱蒸気中で殺菌し、シリコン樹脂を約1.2cc添加して消泡し、ジャーファーマンター2基につき設置する。24℃で300時間、殺菌空気を毎分1.2L通気し、毎分250回転の攪拌機で攪拌しながら、発泡した時はシリコン樹脂を加えながら培養を続けた。この様にして得たジ

さらに最初の活性部をメタノール10ccに溶解させセフアグククスLB-20(500cc)のカラムクロマトグラフィー、メタノール抽出法で活性部は3つのピークと成り1800ccまでと成つて蒸出された。この活性フラクションを減圧濃縮乾燥後、アセトン5ccに溶解させた後ノルマルヘキサン50ccを加えて一夜室温に放置すると化合物1の淡黄色針状結晶が18.5mg得られ、さらに再結晶化で18.0mgの純粋な化合物(1)が得られた。2番目の活性部も同様にセフアグククスLB-20のクロマトグラフィーで不純物を除き、さらに4ccのベンゼンを加えて60℃に加温して溶解させ一夜室温に放置すると20mgの黄色の粗結晶が得られ、同様の方法で再結晶化を行い18.2mgの化合物(2)の淡黄色針状結晶が得られた。

3番目の活性部は重量の3倍量のアルミナ(ダエール社・中性化アルミナ)をメタノールでカラムに充填し、メタノールで溶解させた活性部を通過させると色素だけがアルミナに吸着され無色と成る。この通過液をセフアグククスLB-20

のクロマトグラフィーを行い1番目の活性部と同様に処理すると11.5時の化合物(II)の無色針状結晶が得られた。

実施例 8

タンクによる培養は実施例1と同様にして培養した種母を第1次種母とし、実施例8と同様にして培養した種母を第2次種母として、250ml容のステンレス・スチール製のタンクに、実施例1.8と同様な培養を250ml培養込み120℃で50分間、高純度窒素で致菌し、シリコン樹脂を0.01%添加後、第2次種母を5%培養液とし、部分120mlの殺菌空気を過気し、部分200回転で増殖し、27℃で96時間培養した。

この培養液(タンク250ml)240mlをフィルター・プレスで濾過し、伊液200ml、懸体固形部40gを得た。懸体固形部は80%のメタノールで抽出し、メタノール抽出液70gを得た。伊液は3倍に希釈して80%の固着率を示し、メタノール抽出液は8倍に希釈して80%の固着率を示した。これらの伊液及びメタノール抽出液は興

産例8と同様の比率で同様に抽出精製、結晶化を行い化合物(II)の結晶335mg、化合物(III)の結晶180mg、化合物(IV)の結晶73mgを得た。

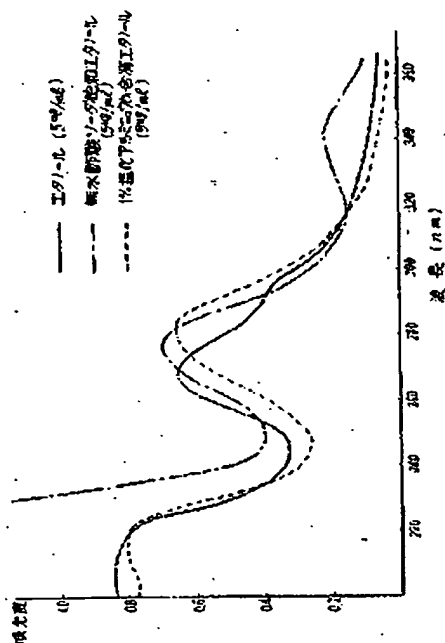
4. 図面の簡単な説明

図1図、第2図、第3図は化合物(II)、(III)、(IV)の5%の純エタノール溶液、無水酢酸ソーダ飽和エタノール懸液、1%過化アルミニウム含有エタノール溶液中での夫々の紫外吸収スペクトル曲線を示す。

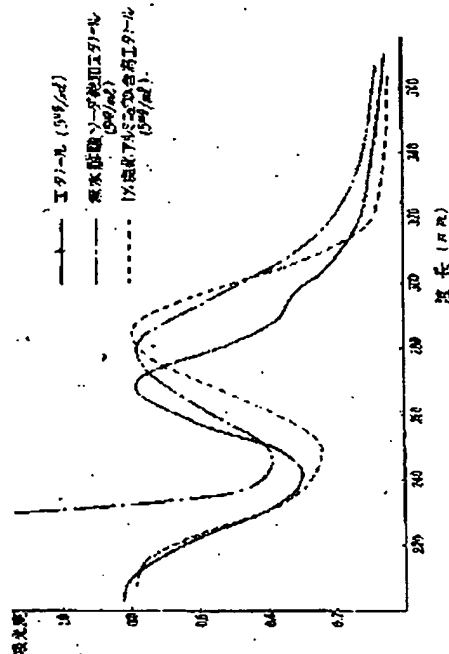
図4図、第5図、第6図は化合物(II)、(III)、(IV)を臭化カリウムとして測定した夫々の赤外線吸収スペクトル曲線を示す。

代理人	金	丸	廣	男
岡	朝	内	忠	夫
岡	八	木	田	茂
岡	浜	野	孝	雄
岡	森	田	哲	二

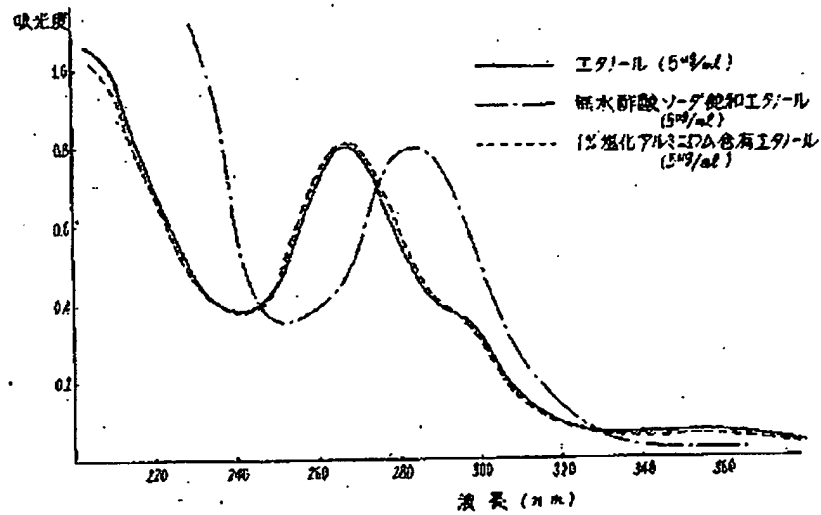
第1図



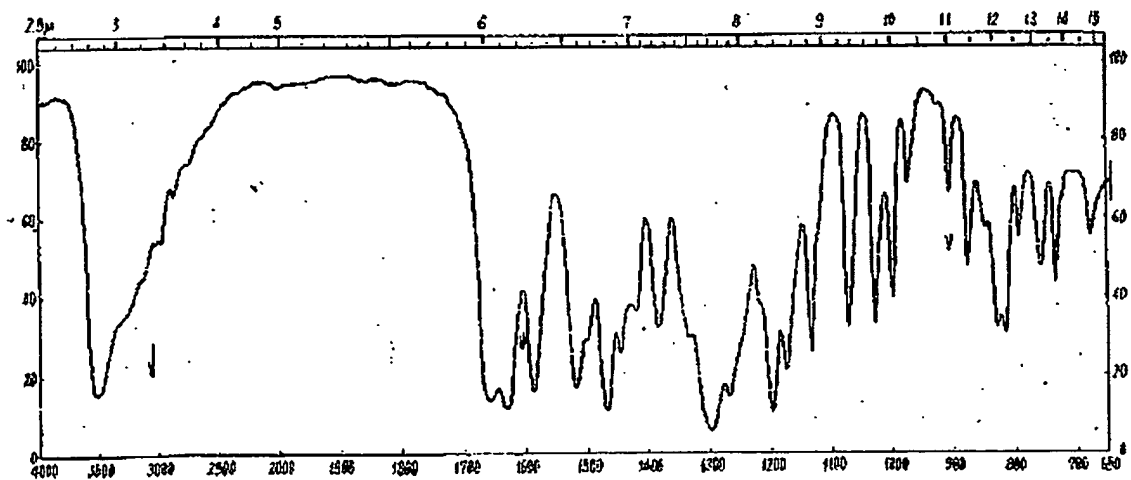
第2図



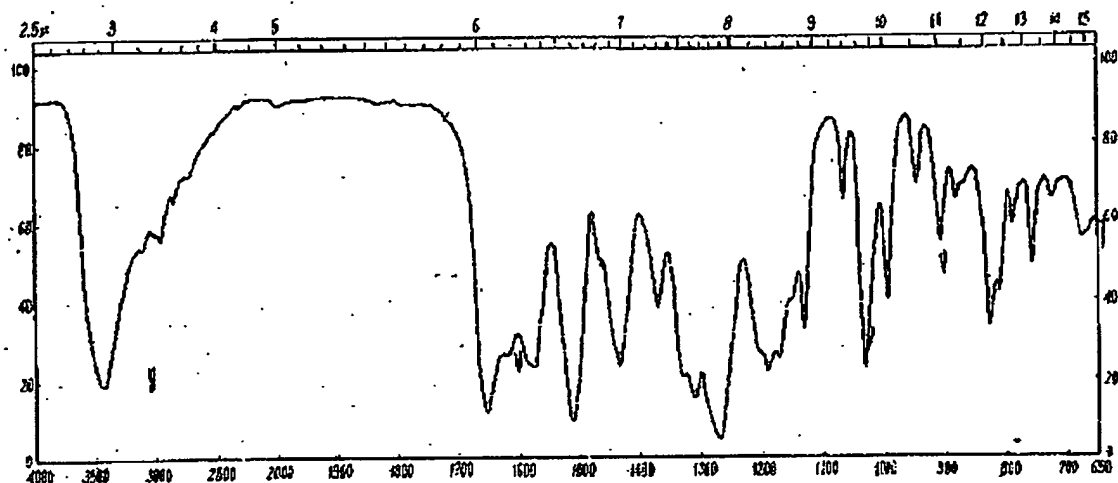
第3図



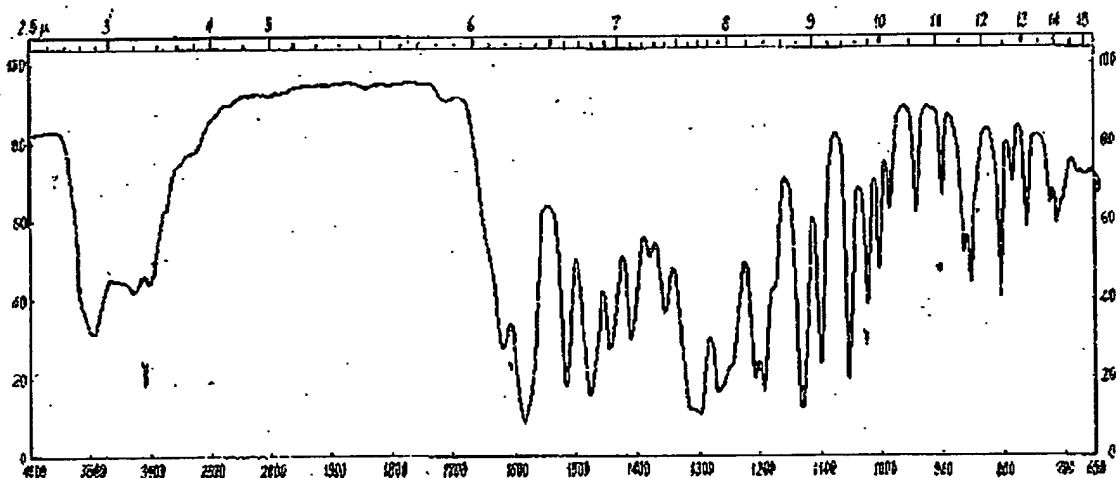
第4図



第5図



第6図



5. 添付書類の目録

- (1) 明細書 1通
(2) 図面 1通
(3) 委任状 1通
(4) 微生物受託番号通知書 1通

6. 前記以外の発明者、代理人

(1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
コナ-アパマンソシオン701-A

氏名 竹内 富雄

住所 東京都北区志茂3の17の1

氏名 幸科 義夫

住所 神奈川県高田郡綾瀬町吉岡1826-51

氏名 沢 分

住所 東京都保谷市富士町1丁目7番3号の4

氏名 関 田 雄

(2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号
三井物産館内

氏名 朝 内 忠 夫

住所 八木田 茂

住所 浜 野 孝 雄

住所 森 田 智 二

2309

手続補正書 (自発)

昭和 48 年 11 月 12 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 48 年 特 許 願 第 83884 号

2. 発明の名称

カテコールオーメタル転移酵素の阻害作用を有する
新規インフラボン化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

事件との関係 発明者本人

住所 東京都品川区上大崎3丁目2番23号

財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産館内

(2400) 氏名 金 丸 義 男

1. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

2. 補正の内容

(1) 明細書第 4 頁第 5 行「コレステロールの増
を」を「コレステロールの沈着を」と修正す
る。

(2) 同 第 6 頁第 1 行「微生物受託番号は第
1706 号」を「微生物受託番号は微生物調査
第 1704 号」と修正する。

(3) 同 第 9 頁第 5 行「Na₂C₄」を「Na₂C₂」と
修正する。

(4) 同 第 12 頁第 1 行「CSMT」を「COMT」
と修正する。

(5) 同 第 14 頁第 1 中化合物 I の欄の上か
ら 7 列目「紫外線吸収」の列の

「1) 267.0 nm (log^ε: 4.303), 295 nm
(9)

2) 287.0 nm (log^ε: 4.301), -

3) 298.0 nm (log^ε: 4.309), 340 nm

9)」を

「1) 267.0 nm (log^ε: 4.303), 295 nm (9)

2) 380.0 nm ($\log \epsilon: 4.301$)

3) 378.0 nm ($\log \epsilon: 4.307$) 390 nm (同)

と修正し、次の

「紫外吸収スペクトル」の列の第1行目・番目の「1388」を「1380」と修正し、次の「NMR (DMSO-d₆)」の列の下から2行目「OCH₃」を「OCH₃」と修正する。更に

後、中化合物名の欄の上から7列目「紫外吸収」の列の3)の行の右端の「-」を削除し、次の「紫外吸収スペクトル」の列の最下空行の「865」の次に「859」を加える。

(6) 同 第17頁裏方行「0.97/00 (1.513 ×)」を「0.97/00 (1.11 ×)」と修正し

(7) 同 同 第8~9行「2.07/00 (1.513 × 10⁻⁵モル)」を「2.07/00 (6.00 × 10⁻⁵モル)」と修正する。

(8) 同 第18頁第6行「上記のように」を「上記のように」と修正する。

(9) 同 同 下から第4行「7.8%」を「7.7%」と修正する。

(10) 同 第30頁第3行「である。」を「である。」と修正する。

(11) 同 第30頁第4行「1000」を「1500」と修正する。

BEST AVAILABLE COPY